

- dit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2003, 23(2): 132-134.
- [12] Xiao H, Niu T, Qi J S, *et al.* Effect of paeonol on inhibition of peroxynitrite on osteoblast differentiation [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17(6): 754-757.
- [13] Weinstein R S, Manolagas S C. Apoptosis and osteoporosis [J]. *Am J Med*, 2000, 108(2): 153-164.
- [14] Davi G, Falco A, Patrono C. Lipid peroxidation in diabetes mellitus [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(1-2): 256-268.
- [15] Suarez-Pinzon W L, Mabley J G, Strynadka K, *et al.* An inhibitor of inducible nitric oxide synthase and scavenger of peroxynitrite prevents diabetes development in NOD mice [J]. *J Autoimmun*, 2001, 16: 449-455.
- [16] Wang Z J, Chen H Z, Xue Q S, *et al.* Effect of panaxynol on rat primary cultured neuron injured by H₂O₂ [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(1): 72-75.
- [17] Tan Y H, He X L, Gao J, *et al.* The clearance effect of eugenol on oxygen-derived free radicals [J]. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 1996, 11(1): 30.
- [18] Mong S, Zhang Z N. The experimental study on anti-oxidative effect of effective component of the traditional Chinese medicine [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1992, 8(5): 326.

萌动激活灵芝孢子促进大鼠受损伤的脊髓运动神经元轴突再生的作用

张 伟¹, 曾园山^{1*}, 陈小君², 陈穗君¹, 钟志强¹

(1. 中山大学中山医学院 组织胚胎学教研室神经科学教研室, 广东 广州 510080;

2. 中山大学 肿瘤防治中心肿瘤研究所, 广东 广州 510089)

摘要:目的 探讨萌动激活灵芝孢子对大鼠坐骨神经切断再吻合后受损伤运动神经元轴突再生的影响。方法 对单侧坐骨神经切断再吻合后的大鼠 ig 给予萌动激活灵芝孢子, 通过电生理、荧光金 (FG) 逆行标记和组织学等方法观察受损伤运动神经元轴突再生情况。结果 坐骨神经切断再吻合 6 周后, 灵芝孢子组坐骨神经再生轴突的动作电位潜伏期及峰峰值的恢复率以及运动神经元胞体的荧光金逆行标记率均明显高于对照组, 灵芝孢子组大鼠腓肠肌萎缩程度也轻于对照组。结论 萌动激活灵芝孢子能够促进大鼠坐骨神经切断再吻合后的脊髓受损伤运动神经元轴突再生。

关键词:萌动激活灵芝孢子; 运动神经元; 轴突再生; 坐骨神经切断再吻合

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)05-0734-04

Effect of germination-activated *Ganoderma* spores on axonal regeneration of injured motor neurons in rat spinal cord

ZHANG Wei¹, ZENG Yuan-shan¹, CHEN Xiao-jun², CHEN Sui-jun¹, ZHONG Zhi-qiang¹

(1. Division of Neurosciences, Department of Histology and Embryology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Cancer Research Institute, Center of Cancer Prevention, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of germination-activated *Ganoderma* spore (GASP) on axonal regeneration of injured motor neuron in rat spinal cord following sciatic nerve cut and anastomosis. **Methods** Rat was ig administered by GASP after the sciatic nerve was cut and anastomosed unilaterally and the axonal regeneration of injured motor neuron was observed by electrophysiology, Fluorogold (FG) retrograde labeling, and histologic techniques. **Results** After six weeks of sciatic nerve cut and anastomosis, the recovery ratio of latency and amplitude of action potential of regenerated axon at sciatic nerve and the ratio of FG-retrograde labeled motor neuronal soma in GASP group were all higher than those in control group. The gastrocnemius atrophy degree in GASP group was also lower than that in control group. **Conclusion** GASP can promote the axonal regeneration of injured motor neuron in rat spinal cord following sciatic nerve cut and anastomosis.

Key words: germination-activated *Ganoderma* spore; motor neuron; axonal regeneration; sciatic nerve cut and anastomosis

祖国传统中药用于周围神经损伤的研究由来已久, 人参、黄芪和当归等均有促进周围神经再生的作

用。又有研究表明党参、黄芪、丹参^[1]、银杏叶提取物 EGb^[2]和补阳还五汤^[3]等都能促进神经再生。灵芝素有“仙草”之称,是中药材宝库中的珍品,萌动激活灵芝孢子(germination-activated *Ganoderma* spore, GASP)是经过萌动激活破壁等特殊加工处理的灵芝的生理细胞。此前研究发现,萌动激活灵芝孢子可促进受损伤的脊髓运动神经元^[4]和脊髓背核神经元的存活^[5],本研究拟进一步探讨其是否可以促进周围神经再生,为临床应用灵芝孢子治疗周围神经损伤提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 动物:SD 雌性大鼠,体重 180~200 g,由中山大学实验动物中心提供,合格证号为(医动字)第 26—99C016 号。

1.2 药物:萌动激活灵芝孢子,由 Holistol International Ltd. 提供(批号 GANSPSP04040104),用时以 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC)配制。戊巴比妥钠,中国医药上海化学试剂公司,批号 F20020915。荧光金,Fluorochrome 公司,批号 4716905。其他药品与试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器:Biolap—410 智能型生物信号显示与处理仪,成都泰盟科技有限公司产品;XTS—4C 型手术显微镜,江苏镇江光学仪器厂产品。

1.4 方法:将 16 只 SD 大鼠随机分为灵芝孢子组($n=8$)和对照组($n=8$)。动物 ip 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,分离暴露大鼠右侧坐骨神经,沿梨状肌下缘约 2 mm 处切断坐骨神经,于手术显微镜下无创缝合线缝合坐骨神经外膜,止血后缝合创口。术后灵芝孢子组动物 ig 萌动激活灵芝孢子 8 g/(kg·d)^[4];对照组动物 ig 等量 CMC。术后大鼠置于笼内正常饲养 6 周。

1.4.1 坐骨神经再生轴突的电生理检测:坐骨神经切断再吻合术后 6 周,麻醉动物后暴露手术侧的坐骨神经和腓总神经。应用 Biolap—410 智能型生物信号显示与处理仪,将刺激电极放置于紧靠吻合口处的远端,记录电极置于腓总神经,未手术侧坐骨神经在对应位置做相同检测。计算机收集数据统计手术侧和未手术侧坐骨神经动作电位潜伏期及峰峰值。计算动作电位潜伏期和峰峰值恢复率。

潜伏期恢复率=手术侧动作电位潜伏期/未手术侧动作电位潜伏期

峰峰值恢复率=手术侧动作电位峰峰值/未手术侧动作电位峰峰值

1.4.2 荧光金逆行标记:在完成电生理检测后于切

断吻合处远端约 10 mm 处将 3% 荧光金 2.5 μ L 用微量注射器注入坐骨神经内,缝合创口,继续饲养 3 d。

1.4.3 腓肠肌湿质量测量及其组织切片的制备:荧光金逆行标记 3 d 后,麻醉动物,取手术侧和未手术侧的腓肠肌称湿质量,计算手术侧肌萎缩率[肌萎缩率=(未手术侧肌肉质量—手术侧肌肉质量)/未手术侧肌肉质量]。随后将肌肉组织置入 4% 多聚甲醛(0.1 mol/L PB 配制,pH 7.4)内固定 24 h,再入 30% 蔗糖(0.1 mol/L PB 配制,pH 7.4)浸泡沉底。恒冷箱切片机切片,片厚 10 μ m,HE 染色。

1.4.4 动物灌注、固定和取材:大鼠取出腓肠肌后,立即经左心室主动脉插管灌注生理盐水 150 mL,随后灌注 4% 多聚甲醛(0.1 mol/L PB 配制,pH 7.4) 400 mL 固定。取 L4 脊髓节段、手术侧吻合处和未手术侧相对应处的坐骨神经,4% 多聚甲醛内固定 4~6 h,再入 30% 蔗糖(0.1 mol/L PB 配制,pH 7.4)浸泡沉底。恒冷箱切片机将 L4 脊髓段作连续横切片,片厚 30 μ m。每隔 4 张取 1 张,每只动物 L4 脊髓段共取 10 张切片。荧光显微镜下计数手术侧被荧光金标记的运动神经元胞体数,中性红复染后在光镜下计数同侧脊髓运动神经元胞体数。计算运动神经元荧光金标记率=荧光金标记的运动神经元数/中性红复染的运动神经元数。坐骨神经于恒冷箱切片机作纵切片,片厚 15 μ m,Mallory 法染色。

1.5 数据处理:所得数据作两独立样本间均数的 t 检验,数据处理均采用 SPSS10.0 统计分析软件。

2 结果

2.1 坐骨神经电生理检测:坐骨神经切断再吻合 6 周后,灵芝孢子组坐骨神经动作电位潜伏期和峰峰值的恢复率分别为 74.62% 和 39.27%,明显高于对照组(表 1,图 1)。

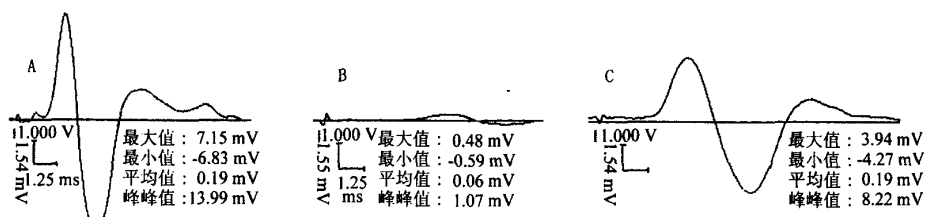
表 1 对照组和灵芝孢子组大鼠坐骨神经切断再吻合 6 周后手术侧电生理、荧光金标记和肌萎缩检测数据的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Data comparison of electric physiology, FG labeling, and muscle atrophy in operated side between control and GASP groups of rats six weeks following sciatic nerve cut and anastomosis ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	动作电位潜伏期 恢复率/%	动作电位峰峰值 恢复率/%	运动神经元胞体 荧光金标记率/%	腓肠肌萎缩率/ %
对照	39.91 $\pm$ 0.25	14.44 $\pm$ 5.62	16.54 $\pm$ 5.10	64.37 $\pm$ 2.86
灵芝孢子	74.62 $\pm$ 0.76 **	39.27 $\pm$ 3.22 **	58.36 $\pm$ 3.93 **	31.29 $\pm$ 2.89 **

与对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group

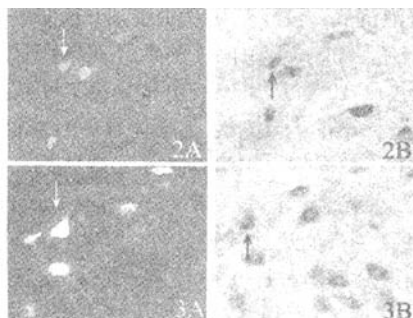


A-未手术侧 B-对照组手术侧 C-灵芝孢子组手术侧 (|)-示意开始电刺激处
A-unoperated side B-operated side in control group C-operated side in GASP group (|)-showing start of stimulation

图 1 坐骨神经切断再吻合 6 周后坐骨神经吻合处远端的动作电位图

Fig. 1 Figure of electric potential in distant side of sciatic nerve anastomotic place six weeks following sciatic nerve cut and anastomosis

2.2 荧光金逆行标记:坐骨神经切断再吻合 6 周后,对照组被荧光金标记的运动神经元胞体皱缩,其荧光较弱,神经突起少而不明显(图 2-2)。灵芝孢子组被荧光金标记的胞体明亮,胞体有较多向四周延伸较长的神经突起(图 2-3)。运动神经元胞体荧光金逆行标记率灵芝孢子组明显高于对照组(表 1)。



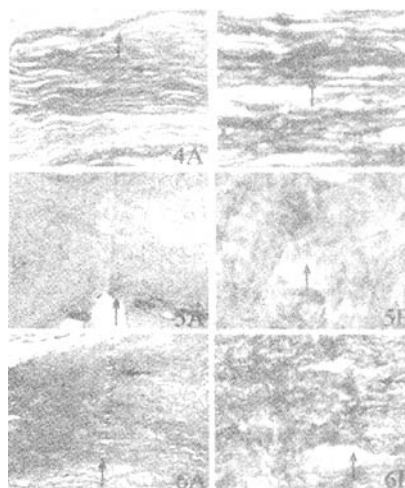
2-对照组 3-灵芝孢子组 A-被荧光金逆行标记的运动神经元胞体(↓) B-与 A 为同一张切片,用中性红复染,与荧光金标记相吻合的运动神经元胞体(↑)

2-control group 3-Ganoderma spore group A-FG-retrograde labeled motor neuronal soma (↓) B-is same section with A, showing same one (↑) with FG-retrograde labeled motor neuronal soma stained by neutral red counterstain

图 2 大鼠坐骨神经切断再吻合 6 周后 L4 脊髓横切片手术侧

Fig. 2 Operated side of cross section of L4 spinal cord 6 weeks following rat sciatic nerve cut and anastomosis

2.3 坐骨神经 Mallory 染色:正常坐骨神经纵切片可见排列整齐的被染成红色的轴突和染成蓝色的髓鞘、结缔组织(图 3-4)。坐骨神经切断再吻合 6 周后,对照组大鼠的吻合处坐骨神经纵切片可见结构排列较紊乱,很少有长过吻合处的轴突(图 3-5)。而灵芝孢子组坐骨神经的纵切片上可见成红色的排列较整齐的轴突长过吻合处(图 3-6)。



4-正常组 5-对照组 6-灵芝孢子组 4A-为染成红色的轴突(←)和染成蓝色的髓鞘和结缔组织(↑) 5A-坐骨神经切断再吻合处(↑) 6A-坐骨神经切断再吻合处(↑)和染成红色的再生轴突(←) B-A 的局部放大,Mallory 染色

4-normal group 5-control group 6-Ganoderma spore group A 4A-showing red axons (←), and blue myelin sheath, and connective tissue (↑) 5A-showing place (↑) of sciatic nerve cut and anastomosis 6A-showing place (↑) of sciatic nerve cut and anastomosis and regenerated red axons (←) B-a local magnification of A, Mallory staining

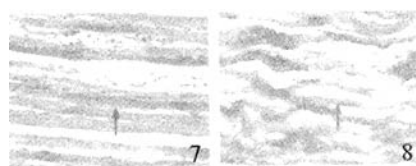
图 3 大鼠坐骨神经纵切片

Fig. 3 Longitudinal section of rat sciatic nerve

2.4 腓肠肌湿质量及其 HE 染色:坐骨神经切断再吻合 6 周后,两组大鼠手术侧后肢肌肉都有不同程度的萎缩,但灵芝孢子组大鼠的肌萎缩程度不如对照组的明显(表 1)。腓肠肌 HE 染色切片可见灵芝孢子组的肌纤维排列较整齐,肌纤维上横纹明显(图 4-7),而对照组肌纤维细小,肌纤维间隙变大,排列紊乱,横纹不明显(图 4-8)。

3 讨论

灵芝孢子是灵芝发育周期中的另一形态,为灵



7-灵芝孢子组 8-对照组 骨骼肌纤维(↑), HE 染色
7-Ganoderma spore group 8-control group Showing
skeletal muscle fiber (↑), HE staining

图 4 大鼠手术侧腓肠肌纵切片

Fig. 4 Longitudinal section of rat gastrocnemius
of operated side

芝的生殖细胞,具有灵芝的全部遗传活性物质。灵芝孢子呈褐色卵形,具双层壁,一般的化学和物理方法很难打破灵芝孢子的双层壁。本研究应用的灵芝孢子是经过萌动激活破壁等特殊处理,其活性物质更容易被利用。灵芝孢子的化学成分复杂,包括蛋白质、氨基酸类、糖肽类、维生素类、甾醇类、三萜类、脂类、脂肪酸类、内酯和微量元素等^[6]。灵芝孢子具有抑瘤和免疫调节等功能,但未有其与神经再生关系研究的报道,本课题组首次发现萌动激活灵芝孢子亦有促进切断再吻合的坐骨神经再生的作用。据研究表明,影响周围神经再生的因素很多,包括神经损伤程度、炎症反应、神经营养因子和氧自由基损害等。因为灵芝孢子的灵芝蛋白^[7]和灵芝多糖^[8]可以明显调节机体的免疫反应,增强巨噬细胞的功能,同时又可抑制过强的免疫反应。因此,可使机体较快地吸收损伤后溃变的组织,降低炎症反应,从而利于周围神经再生。神经营养因子是促进神经再生的重要因素之一,其中的神经营养素-3 (NT-3) 能维持感觉神经元存活,促进运动神经元轴突再生和神经肌肉接头的成熟,减轻神经损伤后肌肉的萎缩^[9]。前期研究已观察到,灵芝孢子可以明显促进轴突损伤后的运动神经元表达 NT-3,其存活率得到明显的提高^[4]。因此本研究推测,表达 NT-3 的运动神经元其受损伤轴突的再生能力也可能会增强。神经损伤导致的脂质过氧化和氧自由基的增加会进一步加剧神经损伤程度。灵芝孢子含有微量元素硒 (Se) 和钴 (Co)。存在于谷胱甘肽过氧化物酶中的硒可与维生素 E—

起协同产生抗脂质过氧化作用,硒也可以抑制氧自由基的生成,通过与抗氧化剂辅酶 Q 的合成,保护生物膜和细胞免受过氧化物损害。而钴通过参与形成辅酶 B₁₂ 利于氧的结合和释放^[10]。另外灵芝孢子中的三萜类成分也有调节免疫功能,清除氧自由基和抗脂质过氧化等作用。所以,萌动激活灵芝孢子促进切断再吻合后的坐骨神经再生可能是以上多种因素共同作用的结果,但其具体作用机制尚待进一步研究。

References:

- [1] Fang Y S, Chen D S, Gu Y D. Facilitated regeneration of rat peripheral nerves with mixture of Dangshen, Astragalus root, red sage root, etc. [J]. *Chin J Hand Surg* (中华手外科), 1998, 114(3): 181-183.
- [2] Zhang F, Gu Y D, Xu J D, et al. Effect of extract of leave *Ginkgo Biloba* on crushed sciatic nerve regeneration [J]. *Chin J Microsurg* (中华显微外科), 2000, 123(4): 279-281.
- [3] Wang X L, Yang L, Li Z H, et al. Experimental study on the effects of a herbal decoction Bu Yang Huan Wu Tang on regeneration of peripheral nerves [J]. *Acta Acad Med Shandong* (山东医科大学学报), 1999, 31(1): 41-43.
- [4] Zhang W, Zeng Y S, Chen S J. Effects of *Ganoderma* spore on soma survival and expression of NT-3 and NOS of spinal motor neuron following ventral root cut in the rat [J]. *Acta Anat Sin* (解剖学报), 2005, 36(5): 471-476.
- [5] Ma Q T, Zeng Y S, Zhang W, et al. Effects of *Ganoderma* spore and L-NNA on the neuronal survival and axonal regeneration in Clarke's nucleus and red nucleus after rat spinal cord injury [J]. *Acta Anat Sin* (解剖学报), 2005, 36(6): 597-603.
- [6] Chen T Q, Li K B, Xu J, et al. Amino acids, fatty acids and element composition of the spores of log-cultivated *Ganoderma lucidum* [J]. *Mycosystema* (菌物系统), 1996, 16(1): 52-56.
- [7] Ye B P, Wang Q H, Zhou S J, et al. Isolating of proteins from Lingzhi and study on its immune activity [J]. *J Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2002, 9(3): 150-152.
- [8] Lei L S, Wang Q B, Sun L S, et al. Effects of *Ganoderma* polysaccharide on production and mRNA expressions of IL-1 α and TNF- α in murine splenocytes *in vitro* [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1998, 14(2): 16-18.
- [9] Novikova L N, Novikov L N, Kellerth J O. Survival effects of BDNF and NT-3 on axotomized rubrospinal neurons depend on the temporal pattern of neurotrophin administration [J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12(2): 776-780.
- [10] Luo Z M. Analysis on the content of trace elements in *Ganoderma* spore and its pharmacology and clinical application [J]. *Guangdong Trace Elem Sci* (广东微量元素科学), 2003, 10(8): 42-48.